

功能菌在清香型宝丰酒生产中的应用研究

卢振营¹,葛少华¹,王晓江¹,樊洪涛¹,杨涛²,吴林蔚²,李国友²,庄名扬²

(1.宝丰酒业有限公司,河南 平顶山 467500;2.中国科学院成都生物研究所,四川 成都 610041)

摘要:从宝丰酒大曲及糟醅中选育产蛋白酶和液化酶活性较高的嗜热芽孢杆菌,从浓香优质窖泥中选育复合产酸菌,应用于宝丰酒酿造工艺中生产出高质量的调味酒,再以此进行宝丰酒产品的勾调,所生产出的国色清香宝丰酒清香纯正、香气幽雅,酒体丰满绵柔,圆润爽净、回味绵长。

关键词:微生物;嗜热芽孢杆菌;复合产酸菌;调味酒

中图分类号:TS262.32;TS261.4;TS261.1;Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-9286(2012)04-0072-04

Research on the Application of Functional Bacteria in the Production of Fen-flavor Baofeng Liquor

LU Zhenying¹, GE Shaohua¹, WANG Xiaojiang¹, FAN Hongtao¹, YANG Tao²,

WU Linwei², LI Guoyou² and ZHUANG Mingyang²

(1. Baofeng Liquor Industry Co. Ltd., Pingdingshan, He'nan 467500; 2. Chengdu Biological Research Institute of CAS, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: *Bacillus stearothersophilus* of higher protease enzyme activity and higher liquefying enzyme activity were isolated from Baofeng Daqu starter and the distiller's grains, then composite acid-producing *Bacillus* was screened out from Luzhou-flavor pit mud, and *Bacillus stearothersophilus* and composite acid-producing *Bacillus* were used to produce high quality flavoring liquor for the blending of Baofeng Liquor. The produced Baofeng Guoseqingxiang Liquor had pure Fen-flavor, elegant aroma, full liquor body, clean taste, and long aftertaste.

key words: microbe; *Bacillus stearothersophilus*; composite acid-producing *Bacillus*; flavoring liquor

清香型白酒在20世纪70年代前是消费量最大的酒种,市场份额占白酒总销量的70%以上,尤其在华北、东北、西北地区占有绝对优势。但随着市场经济的发展,浓香型白酒逐步超越了清香型白酒。究其原因,其中重要一点是浓香型白酒生产技术的改革和创新,如:深入研究发酵机理、微生物功能、香味成分的剖析、应用现代生物技术与传统工艺相结合,集各香型传统工艺的精华,使其风格、口感能与消费者消费习惯的改变与时俱进。

清香型白酒生产企业近年来为了适应消费需求,也逐步汲取了其他一些香型的优点。开发多香结合的产品,如在凤型的复合香,特型酒中提高浓香成分、小曲与大曲并用、生产各类调味酒方面均有长足的进步,取得了明显的经济效益和社会效益,形成清香型白酒消费市场回暖的可喜景象。

宝丰酒业与中国科学院成都生物研究所合作,开展了嗜热芽孢杆菌和复合产酸菌在清香型宝丰酒生产工艺

中的应用研究,采用现代生物技术与传统工艺相结合,汲取其他工艺之精华,将生产出的优质调味酒应用于宝丰酒的勾调中,对改善和提高产品质量有明显成效。

嗜热芽孢杆菌的繁殖与发酵能产生高活力的蛋白水解酶和淀粉酶,在发酵过程中将蛋白质和淀粉酶解成氨基酸和还原糖,高温下发生羰氨反应产生数量众多的杂环类化合物,会增加白酒幽雅细腻、绵柔丰满的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

宝丰酒厂大曲及大糟。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的选育及鉴定

初筛:分别以酪蛋白平板和淀粉水解平板为培养基,采用平皿稀释法^[1],40℃培养,挑取产生透明圈的菌落分离纯化后保存备用。

收稿日期:2012-02-15

作者简介:卢振营(1956-),男,高级工程师,国家白酒评委,享受国务院政府特殊津贴,河南省跨世纪学术和技术带头人培养对象,河南省酿酒大师,从事白酒酿造技术工作20余年,先后参加主持完成省部级科技攻关和技术革新项目20余项,发表科技论文10余篇。

通讯作者:庄名扬(1940-),男,研究员,从事药物化学及酿酒微生物研究工作多年,获得多项创造性成果,对提高中国白酒质量与产量做出了卓有成效的贡献,获国内贸易部、四川省、成都市多项科技进步奖,出版《低度浓香大曲酒生产技术》专著,发表学术论文60余篇。

复筛:将初筛得到的菌株按常规方法做成麸曲,分别采用福林-酚试剂法和 60 °C 法^[2]检测其蛋白酶水解酶活性和液化酶活性。选取酶活性较高的菌株为功能菌株。

功能菌株鉴定:应用传统形态理化特征与现代分子生物学技术相结合的方法将菌株鉴定到种。

形态及理化特征参照《伯杰氏细菌手册》^[3]、《常见细菌系统鉴定手册》^[4]、《菌种保藏手册》^[5]等的方法,测定菌株的菌落及显微特征、接触酶、厌氧生长、V-P 反应、淀粉水解、硝酸盐还原、吲哚反应、明胶穿刺、卵磷脂酶试验、碳源利用、柠檬酸盐利用、丙酸盐利用、氮源利用等形态理化特征。

16S rRNA 基因序列分析参照《现代分子生物学实验》^[6],以细菌通用引物 27F 和 1492R 为引物,扩增 BFB-20、BFB-22 的 16S rRNA 基因序列,扩增后的片段测序(上海生工测序),采用美国国家生物技术信息中心的 BLAST 搜索程序,把实验中得到的序列信息与基因库中的基因序列进行比较获得同源性分析结果。

1.2.2 制作强化高温大曲

利用工艺(见图 1)将分离选育出的具有高蛋白水解酶活性及淀粉酶活性的 2 株菌用于制作强化高温大曲,提高曲药的液化力和蛋白水解力,改善曲香。

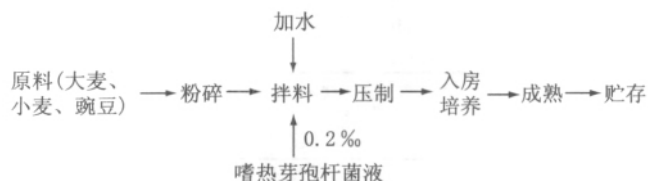


图 1 嗜热芽孢杆菌应用于大曲培制

先将嗜热芽孢杆菌扩大培养,在制曲拌料时将菌液与水混合加入,其他按原工艺进行,培养最高温度为 62~63 °C,中挺时间 7 d 以上。培养 45 d,成品曲贮存 3 个月后使用。

1.2.3 酿造过程菌种的应用

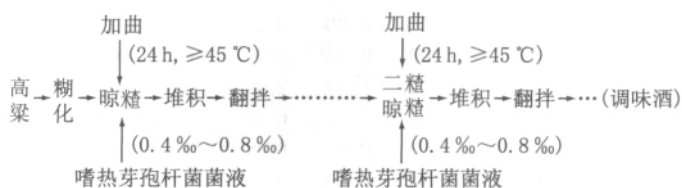


图 2 嗜热芽孢杆菌在酿造过程中的应用

在原工艺中增加高温堆积工序,将嗜热芽孢杆菌扩大培养。在晾糟时,将培养好的菌液加水(40 °C 左右)稀释后,与大曲拌和均匀加入到头糟和二糟酒醅中,拌匀后进行堆积,堆积温度 45 °C,堆积 24 h 后入缸发酵。

1.2.4 复合菌种发酵工艺

清香型白酒与其他香型白酒相比,酒体略显淡薄,较难实现低度化,为了解决这一问题,在生产中还应用从优质浓香窖泥中分离的复合产酸菌(包括甲烷菌、醋酸菌、乳酸菌、丙酮丁醇梭菌、硝酸盐还原菌、硫酸盐还原菌等),不仅可提高酒体中酸酯的种类及含量,使酒体丰满、酯香突出,且增强陈香味,克服后味苦涩感。

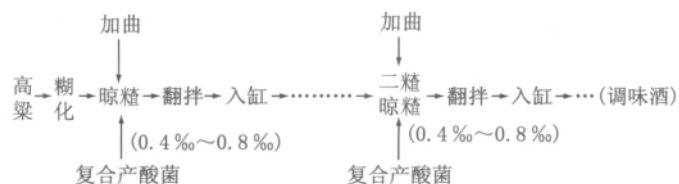


图 3 复合菌种发酵工艺

将复合产酸菌液扩大培养,在晾糟加曲时,将培养好的复合产酸菌液喷洒到头糟和二糟酒醅中,其他工艺条件基本不变。

2 结果与分析

2.1 选育及鉴定

初筛得到 28 株能产生透明圈的菌株,选取透明圈较大的 8 株菌进行复筛,其中 BFB-20 和 BFB-22 2 株菌的蛋白酶活性和液化酶活性均较高(见表 1);通过形态理化特征(见表 2)和 16S rRNA 基因序列分析,BFB-20 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),BFB-22 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

表 1 初筛得到的 8 株菌麸曲的酶活性

菌株编号	酸性蛋白酶活性 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{min}$)	中性蛋白酶活性 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{min}$)	液化酶活性 ($\text{g/g} \cdot \text{h}$)
空白	0	0	0
BFB-6	21.7	132.8	0.7
BFB-11	0	345.0	1.5
BFB-14	89.5	121.6	0
BFB-18	47.3	87.6	0
BFB-19	56.4	36.9	1.20
BFB-20	691.2	700.3	35.2
BFB-22	453.7	263.1	46.4
BFB-25	102.4	113.8	10.8

2.2 强化制曲效果

制成的强化高温曲,其液化力和蛋白水解力均有所提高,曲香味比较突出,结果见表 3。

2.3 复合菌种应用结果

无论是夏季还是冬季,应用复合产酸菌后,酸、酯的种类和含量均有所增加(见表 4)。酒样存放半年后,试验酒样和对照酒样在口感上有明显差异,试验酒酯香味较突出,有陈香味,后味无酸涩感。

2.4 所得菌种应用后的酒质

表2 菌株的形态理化特征及16S rRNA基因序列同源性

项目	BFB-20	BFB-22
形态特征	肉汁琼脂平板上菌落大, 扩展, 具皱纹, 有毛状枝条, 暗白色。G ⁺ , 细胞杆状, 1.9~2.7×0.6~0.8 μm, 无荚膜, 不成链, 产生芽孢, 芽孢椭圆形至柱状, 中生或次端生, 孢子囊无明显膨大。	肉汁琼脂平板上菌落大, 光滑, 圆形, 奶油白色。G ⁺ , 细胞杆状, 1.5~2.4×0.5~0.8 μm, 链状排列, 产生芽孢, 芽孢呈椭圆形, 中生或次端生, 孢子膨大。
接触酶	+	+
厌氧生长	+	+
明胶穿刺	液化	液化
淀粉水解	-	+
V-P 反应	+	+
柠檬酸盐利用	-	+
硝酸盐还原	-	+
卵磷脂酶试验	-	-
氮源利用	利用铵盐	利用铵盐
吡啶试验	-	-
丙酸盐利用	-	+
碳源 D-葡萄糖	产酸不产气	产酸不产气
源 L-阿拉伯糖	产酸不产气	产酸不产气
利 D-木糖	产酸不产气	产酸不产气
用 D-甘露醇	产酸不产气	产酸不产气
16S rRNA 基因序列同源性	短小芽孢杆菌 (99 %)	地衣芽孢杆菌 (99 %)

表3 采取强化措施后试验曲感官及理化指标

曲别	感官	水分(%)	酸度	糖化力(mg/g·h)	液化力(g/g·h)	蛋白水解力(g/100g·h)
对照曲	断面整齐, 呈灰白色, 曲香较淡	12.2	0.9	390	0.90	1.60
春季试验曲	断面整齐, 呈褐色, 曲香味突出	12.2	1.1	124.8	1.25	1.88
秋季试验曲	断面整齐, 呈褐色, 曲香味突出	11.8	1.0	172.8	1.19	1.95
冬季试验曲	断面整齐, 呈褐色, 曲香味突出	11.8	0.9	230.4	1.05	1.79

表4 试验酒样和对照酒样中微量成分对比

项目	(mg/100 mL)						项目	(mg/100 mL)					
	夏季		冬季1		冬季2			夏季		冬季1		冬季2	
	正常班	试验班	正常班	试验班	正常班	试验班		正常班	试验班	正常班	试验班	正常班	试验班
总酸(g/L)	1.36	2.59	1.00	1.31	0.97	1.29	乙酸	43.23	91.25	28.26	37.47	31.44	39.12
总酯(g/L)	5.20	8.81	3.70	5.16	2.45	2.85	糠醛	0.00	4.56	0.00	5.55	0.00	4.56
乙醛	29.70	29.65	28.99	29.11	22.53	22.58	丙酸	3.29	4.73	2.08	2.56	1.78	1.85
甲酸乙酯	3.31	8.22	1.41	4.35	1.26	4.08	2,3-丁二醇(左)	1.72	3.53	0.62	2.48	0.81	2.64
乙酸乙酯	280.24	396.30	140.11	239.29	126.09	160.18	异丁酸	0.00	1.39	0.00	0.99	0.00	0.03
丁酸乙酯	0.00	1.49	0.00	0.76	0.00	0.58	2,3-丁二醇(内)	1.95	2.21	0.75	1.83	0.97	2.37
仲丁醇	1.40	1.59	0.01	0.34	0.01	0.02	丁酸	0.98	1.14	0.86	1.12	0.90	1.14
正丙醇	23.46	20.18	22.46	19.11	20.76	19.02	异戊酸	0.31	0.95	0.12	0.69	0.28	0.55
乙缩醛	0.29	66.98	0.49	80.24	0.49	0.34	戊酸	0.10	0.15	0.00	0.22	0.00	0.17
异丁醇	0.20	17.75	0.18	9.62	0.25	0.20	月桂酸乙酯	0.10	0.10	0.10	0.24	0.13	0.19
乙酸异戊酯	0.64	0.86	0.34	0.49	0.38	0.51	己酸	2.48	2.62	1.04	2.46	1.39	2.67
正丁醇	0.01	1.28	0.00	0.74	0.00	0.00	β-苯乙醇	0.30	0.48	0.22	0.28	0.17	0.23
异戊醇	0.61	11.63	0.67	6.06	0.80	0.70	庚酸	0.00	0.13	0.00	0.20	0.00	0.12
己酸乙酯	0.68	1.63	0.45	0.83	0.41	0.75	辛酸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
正戊醇	0.23	0.37	0.14	0.24	0.23	0.25	棕榈酸乙酯	3.59	4.10	3.34	3.51	2.96	3.13
乳酸乙酯	234.32	481.24	225.63	273.08	117.32	122.25	油酸乙酯	1.45	1.98	1.34	1.47	1.31	1.40
己酸丁酯	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	亚油酸乙酯	1.67	2.27	1.49	1.71	1.38	1.54
辛酸乙酯	0.56	0.90	0.61	0.71	0.45	0.67	乳酸	86.49	156.45	67.81	86.23	61.67	83.52
己酸异戊酯	0.00	0.08	0.00	0.08	0.00	0.07							

应用嗜热芽孢杆菌后, 酒体中杂环化合物的种类比对照样多, 以四甲基吡嗪为代表的杂环化合物的含量几

乎增加了3倍(见表5), 试验酒样存放半年后清香幽雅, 馥郁香明显。

表5 酒样中主要含氮化合物的含量 (μg/L)

组分	对照样 1	试验样 1	对照样 2	试验样 2
2-甲基吡嗪	6.83	40.52	10.12	18.08
2,5-二甲基吡嗪	6.91	24.78	8.99	14.15
2,6-二甲基吡嗪	58.70	188.45	65.70	873.46
2,3-二甲基吡嗪	—	139.12	—	125.62
2,3,5-三甲基吡嗪	13.45	561.59	20.45	504.33
2,3,5,6-四甲基吡嗪	366.04	1718.34	390.45	1429.75

注:对照样 1 和试验样 1 为正常发酵期;对照样 2 和试验样 2 为延长发酵期。

应用上述工艺生产的国色清香宝丰酒清香纯正、香气幽雅、酒体丰满绵柔、圆润爽净、回味绵长,产品质量达到国家优级水平。

3 结论

3.1 从宝丰酒大曲和大糗中分离得 2 株具有高蛋白酶和高液化酶活性的嗜热芽孢杆菌功能菌株,形态生理特征和 16S rRNA 基因序列分析表明,其分别属于地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌。

3.2 在不改变宝丰酒传统酿造工艺基础上,将嗜热芽孢

杆菌应用于生产,由于其具有的高蛋白酶活性可促使原料中的蛋白质酶解成氨基酸,与还原糖发生非酶促褐变反应而产生杂环类化合物,从而增加了酒体中杂环化合物的种类和含量,使酒体丰满绵柔、香气馥郁。

3.3 将从优质窖泥中选育的复合产酸菌应用于生产,可适当增加酒体中酸、酯的含量,使酒体回味绵柔悠长。

参考文献:

- [1] 陈声明,张立钦.微生物学研究技术[M].北京:科学出版社,2006.
- [2] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [3] R.E.布坎南.伯杰细菌鉴定手册[M].8版,北京:科学出版社,1984.
- [4] 东秀珠.常见细菌学系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [5] 中国科学院微生物研究所.菌种保藏手册[M].北京:科学出版社,1980.
- [6] 陆圣栋.现代分子生物学实验技术[M].2版,北京:中国协和医科大学出版社,1999.

(上接第 69 页)

膨化技术酿造的酒酒质良好,风味纯正、回甜。因此,膨化技术结合机械化会有更加广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 黑龙江商学院.应用膨化技术生产淀粉糖的研究报告[R].1987.
- [2] 陆燕,等.膨化技术及其在酿酒工业中的应用[J].酿酒,2002(5):75-78.
- [3] 杨铭择.谷物膨化机理的研究[J].食品与发酵工业,1998(4):7-15.

- [4] 王金山,等.膨化原料酿造白酒的研究[J].酿酒,1988(1):44-45.
- [5] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2008:458-464.
- [6] 王宏卫,张振山.技术在酿酒工艺中的应用[J].四川省食品工业科技,1996(4):44-47.
- [7] 孟阳,等.啤酒辅料膨化工艺的研究进展[J].食品工业,1999(4):6-8.
- [8] 李大和.新型白酒生产与勾调技术问答[M].北京:中国轻工业出版社,2001:201-205.

(上接第 71 页)

踩曲方式制作的曲坯在培养过程中,水分保持程度更好,加上培养温度较高,因而曲坯发酵程度更高,淀粉利用率也高。

3 结论

3.1 人工踩曲和机械制曲两种制曲方式对大曲培养存在着一定的差异性,人工踩曲相对更利于提高大曲培养温度的变化,并利于延长大曲培养温度的“中挺”时间。

3.2 人工踩曲和机械制曲生产的曲坯在外观和色泽上无明显差异性,主要差异体现在香气、断面平整度和皮张上;人工踩曲在影响大曲香气程度、断面平整度和皮张等

感官指标上优于机械制曲。

3.3 在大曲培养过程中,人工踩曲比机械制曲更利于曲坯的保水和淀粉利用率的提高。

参考文献:

- [1] 许安邦,林维宣.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [2] 四特酒有限责任公司.大曲检验规程[Z].2010.
- [3] 章肇敏,吴生文,等.特香型大曲制曲工艺分析[J].酿酒科技,2009(2):63-64.
- [4] 吴生文,章肇敏,等.架子曲与地面曲培养过程中的差异性分析[J].酿酒科技,2009(3):76-78.